

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

PRISCILA DINAH LIMA OLIVEIRA

APLICAÇÃO COMBINADA DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* L. NO CONTROLE DE FUNGOS PATÓGENOS PÓS-COLHEITA

JOÃO PESSOA

2014

PRISCILA DINAH LIMA OLIVEIRA

APLICAÇÃO COMBINADA DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* L. NO CONTROLE DE FUNGOS PATÓGENOS PÓS-COLHEITA

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Profº Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA

2014

O48a Oliveira, Priscila Dinah Lima.

Aplicação combinada de quitosana e óleo essencial de mentha piperita L. no controle de fungos patógenos pós-colheita / Priscila Dinah Lima Oliveira. - - João Pessoa: [s.n.], 2014.

52f.: il. –

Orientador: Evandro Leite de Souza.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Hortelã-pimenta. 2. Quitosana. 3. Alterações pós-colheita. 4. Controle fúngico.

BS/CCS/UFPB

CDU: 582.929.4(043.2)

**Ao Dono da minha vida, meu Aba Pai, meu Deus.
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Ao Deus de toda a glória, Amado da minh'alma, por sua infinita graça, misericórdia e bondade, por ter me escolhido e me amado primeiro, por ter sido e ser, em todo o tempo, o meu Auxílio e meu Amigo, por Sua vontade e mão sustentadora ao me fazer chegar até aqui. Por ser Ele mesmo o meu único Bem. A Ele toda minha vida em expressão de gratidão.

Aos meus pais Nelson e Jane, por serem, antes de tudo, exemplos pra mim. Por tudo o que me ensinaram, por terem acreditado em mim em todo o tempo, sem titubear. Por terem renunciado parte de suas vidas para que eu chegasse até aqui. Por todo amor do mundo.

À Rebeca, minha irmã mais chegada que amiga, pelo apoio e cumplicidade.

À minha família, pelos gestos de carinho e ânimo comigo, pelas raízes que deixaram e que me hoje são parte de mim.

Ao Professor Evandro, pelas orientações e contribuições, bem como por investir em mim durante todo esse tempo. Deixo clara a minha admiração.

À Professora Lúcia, “Luluca”, por ser essa mãezona que me abriu as portas e me instruiu a dar os primeiros passos na apaixonante área de Microbiologia de Alimentos.

À Ingrid, por representar pra mim um exemplo de garra, inteligência e força. Por segurar minhas mãos e me levar junto no seu projeto de Doutorado; pela paciência comigo e pelos dias de aprendizado.

À Ana Júlia, pelas preciosas sugestões para esse trabalho e pela honra que me deu de somar ao seu projeto de Mestrado.

A todos os professores do Curso de Nutrição, que sem dúvida, foram peças-chave do meu crescimento e amadurecimento enquanto estudante e profissional.

Aos meus colegas de curso e do Laboratório (Labinho) de Microbiologia de Alimentos, por todas as risadas e vivências, pelos dias de alegria e pelos momentos de cansaço. Juntos pudemos ser mais. Em especial a Andreza, Edjeise e Laís Carvalho, de colegas a amigas para a vida.

Aos meus amigos, que são minha riqueza, em especial a Céu e Maria Eunice, pela constante presença e preocupação com esta produção.

A todos, que de alguma forma, são parte da minha vida e construíram essa história junto comigo, meu muito obrigada.

*“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do
Senhor fez isto, e o Santo de Israel o criou.”*

(Isaías 41:20)

RESUMO

Inúmeros fatores têm interferido na redução da produção de alimentos. Dentro desse âmbito, o ataque de fungos patógenos tem recebido destaque, por ser de grande impacto na agricultura. As doenças pós-colheita são responsáveis por perdas, em muitos casos, superiores a 50%. O controle das doenças e pragas na agricultura tem se intensificado, sendo realizado basicamente através do emprego de produtos sintéticos, que tem causado resistência dos organismos, demandando uma quantidade cada vez maior, o que tem levado a sérios riscos ambientais e de saúde da população. Esse estudo objetivou avaliar a eficácia da aplicação combinada de (QUI) e do óleo essencial (OE) de *Mentha piperita* L. como compostos antimicrobianos alternativos naturais para a inibição de *Rhizopus stolonifer* (URM 3728), *Aspergillus niger* (URM 5842), *Aspergillus flavus* (URM 4540), *Botrytis cinerea* (URM 2802) e *Penicillium expansum* (URM 3396), patógenos de grande destaque, em meio laboratorial. A QUI e o OE de *M. piperita* apresentaram valores da concentração inibitória mínima de 8 mg/mL e de 5,0 µL/mL, respectivamente, frente a todos os fungos estudados. A aplicação combinada de QUI e OE de *M. piperita* L. em diferentes concentrações inibitórias e subinibitórias causou redução significativa do crescimento de *A.flavus*, *A. niger*, *R. stolonifer*, *B.cinerea* e *P.expansum* (>96%). A inibição da germinação esporica também alcançou valores expressivos (>90%) em todas as concentrações, frente a todos os fungos. O destacável efeito antifúngico, observado em consequência da aplicação conjunta de QUI e do OE de *M. piperita* L. em concentrações subinibitórias sugere um efeito antifúngico potencializado na diminuição das perdas pós-colheitas, decorrentes da ação de tais contaminantes biológicos.

Palavras-chave: hortelã-pimenta, quitosana, alterações pós colheita, controle fúngico

ABSTRACT

Numerous factors had interfered in the reduction of food production. Within this framework, the attack of pathogenic fungus have received prominence, due to their big impact in agriculture. The postharvest diseases are responsible for losses, in many cases, up to more than 50%. The control of diseases and pests in agriculture have been intensified and carried out through the usage of synthetic products, that has caused organisms' resistance, demanding increased amounts of them, what is leading to serious environmental and population health risks. This study aimed to evaluate the effectiveness of the combined application of (CHI) and the essential oil (EO) of *Mentha piperita* like natural alternative antimicrobial compounds to the inhibition of *Rhizopus stolonifer* (URM 3728), *Aspergillus flavus* (URM 4540), *Botrytis cinerea* (URM 2802) e *Penicillium expansum*(URM 3396), highlighted pathogens, in the laboratory field. The CHI and the EO from *M. piperita* present minimum values of inhibitory concentration of 8 mg/mL and 5,0 µL/mL, respectively, facing all the studied fungus. The combined application of CHI and EO from *M. piperita* L., in distinct inhibitory and subinhibitory concentrations caused significant reduction in the growth of *A. flavus*, *A. niger*, *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *P. expansum* (>96%). The inhibition of the spores germination also achieved expressive values (>90%) in all the concentrations, facing all the fungus. The remarkable antifungal effect, observed in the consequence of the joint application of CHI and EO from *M. piperita* L., in subinhibitory concentrations, suggests a potentiated antifungal effect in the decrease of the postharvest losses arising the action of such biological contaminants.

Keywords: peppermint, chitosan, postharvest changes, fungal control

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Rendimento (média e desvio padrão) da quitina e quitosana obtidas a partir do resíduo industrial do camarão <i>L. vannamei</i>	29
TABELA 2	Composição química do óleo essencial de <i>M. piperita</i> L.....	30
TABELA 3	Concentração inibitória mínima (CIM) das cepas reveladoras de atividade em função das concentrações de quitosana aplicadas.....	32
TABELA 4	Concentração inibitória mínima (CIM) das cepas reveladoras de atividade em função das concentrações de óleo essencial de <i>M. piperita</i> L.....	33
TABELA 5	Inibição do crescimento micelial radial do <i>A. flavus</i> URM 4540, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de <i>M. piperita</i> L.....	34
TABELA 6	Inibição do crescimento micelial radial do <i>A. niger</i> URM 5842, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de <i>M. piperita</i> L.....	35
TABELA 7	Inibição do crescimento micelial radial do <i>R. stolonifer</i> URM 3728, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de <i>M. piperita</i> L.....	36
TABELA 8	Inibição do crescimento micelial radial do <i>B. cinerea</i> URM 2802, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de <i>M. piperita</i> L.	36
TABELA 9	Inibição do crescimento micelial radial do <i>P. expansum</i> URM 3396, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de <i>M. piperita</i> L.....	37
TABELA 10	Inibição da germinação esporica de <i>A. flavus</i> (URM 4540), <i>A. niger</i> (URM 5842), <i>R. stolonifer</i> (URM 3728), <i>B. cinerea</i> (URM 2802) e <i>P. expansum</i>	

(URM 3396) quando expostos a diferentes combinações de quitosana e óleo
 de *M. piperita*
 L.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QUI	Quitosana
OE	Óleo essencial
%	Por cento
µm	Micrômetro
USDA	United States Department of Agriculture
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
β	Beta
ISO	International Standard Organization
Ltda	Limitada
®	Registrado
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
mL	Mililitro
NaOH	Hidróxido de sódio
µL	Microlitro
g/mL	Gramas por mililitro
µL/mL	Microlitro por mililitro
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
Rpm	Rotações por minuto
CIM	Concentração Inibitória Mínima
mm	Milímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 DETERIORAÇÃO FÚNGICA PÓS-COLHEITA	15
2.2 FUNGOS FITOPATÓGENOS	16
2.2.1 <i>Rhizopus stolonifer</i>	16
2.2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	17
2.2.3 <i>Aspergillus flavus</i>	18
2.2.4 <i>Aspergillus niger</i>	18
2.2.5 <i>Penicillium expansum</i>	19
2.3 ALTERNATIVAS BIOLÓGICAS NO CONTROLE FÚNGICO	19
2.2.1 Quitosana	19
2.2.2 Óleos Essenciais	21
2.2.2.1 Óleo Essencial de <i>Mentha piperita</i> L.	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 DESENHO DE ESTUDO	24
3.2 OBTENÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	24
3.2.1 Obtenção da quitosana	24
3.2.2 Obtenção dos óleos essenciais	24
3.2.3 Obtenção dos micro-organismos teste	25
3.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	25
3.4 PRODUÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL	26
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM	26
3.6 INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL FÚNGICO	27
3.7 INFLUÊNCIA SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESPOROS FÚNGICOS	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 PRODUÇÃO E RENDIMENTO DA QUITINA E QUITOSANA	29
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> L.	29
4.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	31
4.4 INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL FÚNGICO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS	
5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional habitacional, além de diminuir as áreas apropriadas ao cultivo agrícola, tem aumentado a demanda por alimentos. Estima-se que no ano de 2050, a população mundial alcance nove bilhões de habitantes, o que requer o aumento da produção de alimentos a fim de suprir as necessidades dos indivíduos. Diante de inúmeros fatores que interferem na redução da produção de alimentos, as doenças causadas por fungos patogênicos têm recebido destaque, por serem de grande impacto na agricultura (CARRER, et al., 2010; BRUM, 2012). A deterioração causada por patógenos é a principal causa de perdas em pós-colheita (BOWER, 2007), sendo os fungos responsáveis por 80 a 90% do total do prejuízo (OLIVEIRA et al., 2006).

O controle das doenças e pragas na agricultura têm se intensificado, sendo realizado basicamente através do emprego de produtos químicos sintéticos. No entanto, a utilização indiscriminada tem se mostrado ineficiente, já que diversos organismos têm apresentado crescente resistência a tais produtos, demandando a utilização de quantidades cada vez maiores (SANTOS et al., 2006). A produção de alimentos com uma mínima degradação dos recursos naturais tem se mostrado uma exigência da sociedade, sendo que há uma crescente preocupação da população em consumir alimentos saudáveis com uma produção associada à preservação do meio ambiente, o que tem tornado o uso de agentes químicos uma prática questionável.

Deste modo, vários métodos alternativos de controle de doenças vêm sendo estudados (SILVA et al., 2010). Tais métodos alternativos podem proporcionar o controle biológico dos agentes fitopatógenos e a indução de resistência em plantas. Dentre esses, destacam-se o uso de óleos essenciais, e do envoltório de quitosana (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005; CAPDEVILLE et al., 2002).

A quitosana é um polímero natural, atóxico e biodegradável, obtida por meio da desacetilação alcalina da quitina, que é encontrada naturalmente nas paredes celulares de alguns fungos e compõe a maior parte do exoesqueleto de insetos, crustáceos e invertebrados marinhos (PEN & JIANG, 2003; DEVLIEGHERE et al., 2004; HAN et al., 2005; MAZARO et al., 2008). O exoesqueleto de crustáceos, principalmente de camarões, é a principal fonte natural para a obtenção de quitina e quitosana (DAMASCENO; ANDRADE; STAMFORD, 2007; THARANATHAN; KITTUR, 2003).

A captura e o processamento do camarão têm gerado um considerável volume de resíduo de cascas, que não é utilizado na fabricação de ração animal, dado o elevado conteúdo

em fibras. Esse resíduo gerado é normalmente enterrado ou jogado clandestinamente em rios ou no mar, ocasionando grande impacto ambiental. A casca de camarão apresenta baixíssimo valor comercial, além de ser uma fonte de poluição ambiental, com geração custos adicionais durante o descarte, diminuindo os lucros do sistema de produção. Uma alternativa de agregação de valor para este material seria a utilização na extração de quitina para a produção quitosana. (DE ASSIS, 2009; CIRA et al, 2002).

Outros compostos têm sido estudados no controle de fungos fitopatógenos, apresentando resultados destacáveis, a exemplo dos óleos essenciais. Vários estudos têm comprovado o efeito de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na capacidade de controlar doenças em plantas, em decorrência da sua atividade antimicrobiana estabelecida de forma direta ou indireta (CHAO; YOUNG, 2000; FIORI et al., 2000; BASTOS & ALBUQUERQUE, 2004). Segundo Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais são compostos complexos, naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor. Podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas e podem ser extraídos através dos métodos de destilação por arraste com vapor d'água, bem como por compressão dos pericarpos, no caso de frutos cítricos. Tais óleos podem ser formados por cem ou mais compostos orgânicos, a exemplo dos álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta em menor proporção, e os monoterpenos e sesquiterpenos, encontrados com maior frequência. (CASTRO et al., 2004; CASTRO et al., 2010; COSTA et al., 2008; NICARETA, 2006).

A hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.), um híbrido natural entre *M. aquatica* e *M. spicata*, pertencente à família Labiatae, é uma das espécies produtoras de terpenoides mais exploradas comercialmente (MAFFEI; MUCCIARELLI, 2003), sendo uma rica fonte de mentol (DOMIJAN et al, 2005). Extratos originários de *M. piperita* L. têm evidenciado propriedades antifúngicas, demonstrando efetividade no controle do crescimento de patógenos de plantas (BELMONT; MOCTEZUMA, 2001). Seu óleo essencial, considerado não tóxico a humanos (ANSARI et al, 2000), apresenta, além de propriedades antifúngicas (EDRIS; FARRAG, 2003; PANKAJ et al, 2003), propriedade antiviral (SCHUHMACHER, 2003) e antibacteriana (PATTNAIK et al, 1996). Carretto et al (2010) detectaram a atividade inibitória do óleo essencial de *M. piperita* L. contra 39 cepas do fungo *Candida*, sendo a *C. albicans* a de maior sensibilidade ao óleo essencial.

Frente ao reconhecido potencial biológico da quitosana e do óleo essencial de *M. piperita* L., o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da aplicação combinada de quitosana e do óleo essencial de *M. piperita* L. na inibição de *R. stolonifer*, *A. niger*, *A. flavus*, *B. cinerea* e *P. expansum* em meio laboratorial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DETERIORAÇÃO E CONTROLE FÚNGICO PÓS-COLHEITA

Estima-se que em 2050 a população poderá alcançar um número de 9,1 bilhões de habitantes (FAO, 2009). O consequente aumento da demanda por alimentos, dado o crescimento populacional, tem sido uma preocupação a nível mundial. Um dos aspectos de maior importância na produção até a pós-colheita de produtos agrícolas são as perdas pós-colheita, que podem chegar à ordem de 20% a 50%, em algumas variedades de vegetais (RODRIGUES, 2006). As doenças ocasionadas por fungos são as principais responsáveis pelos prejuízos, chegando a cerca de 90% do total (CHITARRA; CHITARRA, 2005; DANTAS et al., 2003), sendo de grande importância econômica. *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* têm recebido grande destaque.

Tais fitopatógenos podem afetar todas as partes das plantas, desde o sistema radicular até os frutos, sendo que nestes os prejuízos são mais visíveis e preocupantes, tendo em vista a drástica redução que provocam na produtividade e na qualidade (GADELHA, 2002), acarretando diminuição da vida de prateleira dos produtos hortícolas, resultando em doenças superficiais, com a destruição de tecidos ou defeitos, o que torna o produto menos atrativo ou não comercializável. Esses danos são particularmente indesejáveis em vegetais destinados ao consumo *in natura*, pela ênfase dada à qualidade visual do produto (NICOLAU, 2009).

Métodos físicos, químicos e biológicos vêm sendo empregados, visando o controle deste grupo de doenças, sendo que o controle químico feito pela aplicação de fungicidas sintéticos pertencentes ao grupo dos benzimidazoles, hidrocarbonetos aromáticos e inibidores da biossíntese do esterol tem sido a principal medida para reduzir a incidência de doenças pós-colheita em frutos (ISMAIL; ZHANG, 2004). Estes produtos, a curto prazo, auxiliam de maneira eficaz o agricultor no alcance de altas produtividades, no entanto, a longo prazo, tem se observado o surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, o que resulta em efeitos negativos para o meio ambiente, devido à poluição causada pelos resíduos (SCHWAN-ESTRADA et al, 2000); e para a sociedade, por apresentar riscos e danos à saúde como carcinogenicidade, teratogenicidade, alta e aguda toxicidade residual. A influência sobre os caracteres organolépticos dos alimentos e efeitos colaterais em humanos têm levado ao uso restrito de tais fungicidas químicos no controle da deterioração pós-colheita (UNNIKRISHNAN; NATH, 2002).

Devido aos efeitos negativos do uso de fungicidas químicos, tem-se visto a necessidade de controles alternativos (SCHWAN-ESTRADA et al, 2003; MICHEREFF, 2006). Os métodos biológicos se constituem em alternativas viáveis em relação ao método químico tradicional, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos nos produtos tratados. O biocontrole, caracterizado como o uso de organismos e/ou seus produtos derivados ou metabólitos para prevenção de doenças em vegetais, é ecologicamente viável, normalmente seguro, e pode prover proteção por um longo prazo para a cultura (SAN-LANG et al., 2002; FERNANDO et al., 2005).

Alguns agentes empregados no processo de biocontrole têm se mostrado eficientes da deterioração pós-colheita de vegetais (CAPDEVILLE et al. 2002). Entre as alternativas, tem se dado destaque ao uso da quitosana e dos óleos essenciais (TRIPATHI Y DUBEY, 2004) no uso de revestimento de frutos. Coberturas comestíveis com intuito de reduzir a contaminação por fungos tem sido uma tendência nacional e internacional. (WANG et al., 2009).

2.2 FUNGOS FITOPATÓGENOS

2.2.1 *Rhizopus stolonifer*

O gênero *Rhizopus* sp. é representado por aproximadamente 158 espécies de fungos, sendo uma delas *R. stolonifer* (Ehrenb.) vuill. Esta espécie apresenta três variações: *R. stolonifer* var. *luxurians*, *R. stolonifer* var. *lyococcus* e *R. stolonifer* var. *stolonifer*, sendo este descrito pela primeira vez no ano de 1902 (INDEX FUNGORUM, 2014).

R. stolonifer se caracteriza como um dos principais responsáveis por perdas pós-colheita, ganhando grande destaque por causar danos em culturas diversas como graviola, fruta-do-conde, jaca, pêssago, mamão, café, morango, dentre outras espécies de importância econômica (CENARGEN, 2014). Segundo Fischer et al. (2008), em experimento quantificando os danos de fungos em pós-colheita em frutos de pêssago foram encontrados que 6,1% dos danos são causados por *Rhizopus* sp. Os problemas ocasionados por esse fitopatógeno podem ser incidentes desde a época da colheita, com os frutos ainda na planta, principalmente em épocas chuvosas. Os frutos afetados caem prematuramente e o apodrecimento continua no solo. Pode ocorrer mumificação dos frutos tanto na planta quanto no solo.

A podridão-mole, também conhecida como podridão-de-*Rhizopus* é uma típica doença de pós-colheita, que ocorre pela suscetibilidade dos tecidos vegetais durante o processo de

amadurecimento, bem como pelos ferimentos causados no fruto (COSTA; VENTURA, 2006). Tais frutos, quando atacados, apresentam alteração na cor e na consistência, assim como um visível crescimento micelial de características densa e branca. A infecção pelo fungo ocorre pela presença do inóculo na superfície do fruto, que pode apresentar aspecto semelhante ao da podridão mole (SCARIOT, 2013).

A literatura ainda relata o ataque comum do *R. stolonifer* sobre frutos do tomateiro (SILVEIRA et al., 2001); como causa de podridão mole ou podridão floral do maracujazeiro, que atacam as flores recém abertas e frutos novos (BOMFIM et al., 2007); em ameixa e nectarina (GONÇALVES, 2005); e ainda interferindo na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de abóboras (CASAROLI, 2006). Kimati (2005) relata que, em acerolas, o patógeno causa prejuízos expressivos, danificando os frutos e deixando-os inviáveis ao consumo *in natura* e também para a indústria.

A podridão pode causar danos antes que os frutos cheguem ao mercado consumidor, o que acarreta depreciação do produto e consequentemente pouco ou nenhum valor comercial (CENARGEN, 2014).

2.2.2 *Botrytis cinerea*

O fungo *B. cinerea* é o agente causal do mofo-cinzento, uma das mais representativas doenças pós-colheita. Quando isolado em meio de cultura, apresenta colônias de coloração acinzentada e produz conídios medindo entre 11 µm a 15 µm (MAAS, 1998; TANAKA, 2002). Esse fungo caracteriza-se como um patógeno saprófita em matéria orgânica e de difícil controle (MORANDI; MAFFIA, 2005).

A grande produção de enzimas e toxinas desse patógeno facilita a sua ocorrência em vários gêneros de plantas (KAMOEN, 1992). A infecção causada por *B. cinerea* geralmente inicia-se em tecido debilitado da própria planta ou de plantas hospedeiras, desenvolvendo-se saprofiticamente em ramos, folhas e flores, especialmente pétalas senescentes, para posteriormente infectar os tecidos saudáveis do fruto. (VALDEBENITO SANHUEZA, 2004).

As lesões decorrentes desse fitopatógeno, em frutos maduros, rapidamente tomam a superfície do fruto, e se caracterizam por um crescimento acinzentado constituído por estruturas do fungo que podem causar apodrecimento dos frutos (TÖFOLI; DOMINGUES, 2005). Ferimentos na epiderme dos frutos, lesões ocasionadas por insetos, aberturas naturais como lenticelas ou o extremo floral muito aberto, favorecem a penetração e colonização do tecido pelo fungo nos locais de armazenamento (CANAVER, 2010).

O gênero *Botrytis* tem ganhado destaque pela alta agressividade e dispersão como patógeno pós-colheita, causando perdas substanciais com grande impacto econômico na produção (CANAVAR, 2010). A sua ação ocorre desde a pré-colheita até a pós-colheita, inclusive nas fases de transporte e armazenamento dos frutos.

2.2.3 *Aspergillus flavus*

A. flavus é considerado um patógeno oportunista, capazes de causar diversas desordens em variadas plantas, além de acometer os produtos agrícolas em todas as etapas da cadeia de produção, especialmente na pós-colheita (VARGAS et. al., 2004; MONTEIRO, 2012). Apresenta colônia com coloração verde-amarelada, sendo tal coloração responsável pela característica superficial do patógeno (ANDRADE; LIMA, 2010).

Segundo Farr e Rosman (2014), no banco de dados USDA (United States Department of Agriculture), há relatos do *A. flavus* no mundo em diversas culturas, a exemplo de cebola-de-cabeça, alho, caju, amendoim, aveia, castanha-do-pará, canola, feijão-de-porco, grão-de-bico, limão, tangerina, coco, inhame, soja, lentilha, tomate, manga, banana, arroz, maracujá, feijão, ervilha, amêndoa, pêssego, cana-de-açúcar, batata, cacau, trigo, fava e milho. Ainda, este fungo é amplamente conhecido pela produção de toxinas, que apresentam potencial para causar doenças em animais e seres humanos (VIEGAS et al., 2005).

2.2.4 *Aspergillus niger*

A. niger é um fungo filamentosos negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995) ou “mofo preto”, sendo caracterizado por apresentar cabeças conidiais escuras, geralmente negras, e conidióforos hialinos marrom, com cabeças globosas; apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (UCSF, 2000). Está distribuído por todo mundo, comumente presentes em materiais de decaimento de plantas .

Esse fitopatógeno cresce em material orgânico em ampla faixa de temperatura (6 a 47 °C) e de pH (1,4-9,8) (SCHUSTER et al, 2002), tendo limite de crescimento para atividade de água de 0,88, o qual é relativamente alto, quando comparado a outras espécies de *Aspergillus*.

A presença do *A. niger* na produção pós-colheita é um fator limitante na qualidade e na quantidade de frutos. Segundo Vargas et al. (2004), semelhantemente ao *A. flavus*, o *A. niger* também tem sido considerado um patógeno oportunista, dada as diversas desordens

causadas em uma variedade de plantas em todas as fases de produção, inclusive na pós-colheita. *A. niger* é vastamente presente em frutas e vegetais, como uvas, cebolas e amendoins, sendo também contaminante comum de outros alimentos (SHARMA, 2012).

2.2.5 *Penicillium expansum*

Penicillium sp. é um fungo pós-colheita, de grande ocorrência em sementes e frutos, bem como um importante atuante na decomposição de madeiras. São fungos contaminantes; endofíticos (colonizam os tecidos de plantas), causadores de mofo azul, mofo cinzento, podridão das raízes, podridão pós-colheita de maçã, perda do poder germinativo e podridão nos frutos. Atualmente, são conhecidas 131 espécies de plantas hospedeiras de *Penicillium* sp. no Brasil, a exemplo do quiabo, cebola, alho, cajueiro, angico, abacaxi, laranjeira, soja, uva, maçã, milho, tomateiro e feijão fradinho (EMBRAPA, 2010).

O mofo azul, causado por *P. expansum*, é uma das principais doenças em pós-colheita. O aspecto típico da doença é a ocorrência de uma podridão de textura firme, relativamente seca, irregular, não deprimida e, geralmente, profunda. Na epiderme e na polpa, apresenta cor bege, inicialmente clara, sem margens definidas. Com o avanço do apodrecimento, a lesão se torna marrom-escura, com as bordas mais claras. Os frutos completamente podres aparentam ter sido amassados e exalam um odor de cidra doce (VALDEBENITO SANHUEZA, 2004).

O local de penetração do patógeno apresenta-se como uma mancha aquosa e translúcida, adquirindo coloração bege-claro tanto na epiderme como na polpa. O tecido afetado pode ser facilmente destacado da parte sadia do fruto. Com a evolução da doença e em condições ambientais favoráveis, há o surgimento de sinais de coloração branca, evoluindo para a cor azul-esverdeada sobre as lesões, indicando a esporulação do patógeno (CANAVAR, 2010). Segundo VINAS et al. (1998), esse fitopatógeno é responsável por 80 a 90% das perdas ocasionadas por podridões em pós-colheita de maçãs.

2.3 ALTERNATIVAS BIOLÓGICAS NO CONTROLE FÚNGICO

2.3.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero obtido pela desacetilação alcalina da quitina, um dos polissacarídeos mais abundantes da natureza, composto por ligações β (1 \rightarrow 4) de N-acetil D-glicosamina, encontrado em muitas espécies de animais marinhos e plantas inferiores, além de compor parede celular de leveduras e exoesqueleto de invertebrados como camarão, siri,

caranguejos e insetos (NEVES et al., 2013). A remoção parcial dos grupos acetamida, presentes na quitina, pela reação de desacetilação, gera o biopolímero da quitosana, rico em grupos amina. Quando esta desacetilação supera o valor de 50%, o biopolímero torna-se solúvel em soluções aquosas ácidas e se comporta como um polieletrólito catiônico, devido à protonação dos grupos amina em presença de íons H^+ , caracterizando este material como quitosana e não mais quitina (TOLAIMATEA et al, 2003).

É um produto natural, de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, e tem sido proposta como um material potencialmente funcional para usos diversos, a exemplo na área alimentícia, da biotecnologia, ciência dos materiais, tratamento de água, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura, proteção ambiental e terapia genética (AZEVEDO et al., 2007). Além disso, não possui nenhuma toxicidade ao homem (RAMOS BERGER et al, 2011).

As principais fontes de obtenção da quitosana explorada a nível comercial tem sido a carapaça de crustáceos, tais como caranguejos e cascas de camarão (FAI et al, 2008; RINAUDO, 2006), entretanto também pode ser obtida da biomassa micelial de fungos (RAMOS BERGER et al, 2011).

Na agricultura, seu emprego está tomando importância pela sua atividade antimicrobiana sobre uma grande variedade de fitopatógenos (EL GHOUTH et al., 1992; EL GHOUTH et al., 1997; BHASKARA REDDY et al., 2000; DEVLIEGHERE et al., 2004). A quitosana pode retardar o crescimento micelial, diminuir a germinação de conídios e causar alterações morfológicas no tubo germinativo de algumas espécies de fitopatógenos (EL GHOUTH ET AL., 1992; LIU ET AL., 2007).

As principais propriedades da quitosana são: bioatividade, degradabilidade, biocompatibilidade, reatividade do grupo amino deacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, habilidade de quelação, capacidade adsorviva e habilidade em formar gel (SYNOWIECK & AL-KHATEEB, 2003. THARANATHAN & KITTUR, 2003), sendo esta última, importante propriedade para elaboração de filmes de proteção em frutos e vegetais (CÉ, 2009).

Dentre as inúmeras características que distinguem a quitosana e seus derivados dos demais polissacarídeos, destaca-se a sua potencialidade antimicrobiana. O mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos não está completamente elucidado, porém diversas hipóteses têm emergido. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados, provavelmente, se ligam à superfície celular, carregada negativamente, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana causando perda de

componentes intracelulares (AVADI et al., 2004; TSAI; HWANG, 2004; YADAV; BHISE, 2004).

Esse polímero tem sido reconhecido como um antimicrobiano natural com possibilidade de aplicação em combinação com óleos essenciais. Possui características físico-químicas que resultam em propriedade de fácil formação de gel, vindo quando aplicada em frutos a exercer uma função de barreira mecânica à perda de umidade, de forma simultânea ao estabelecimento de sua propriedade antimicrobiana. Tais géis, quando aplicados sobre frutos formam filmes protetores comestíveis (com estrutura nanoporosa) com peculiaridades de apresentarem-se invisíveis, com aderência suficiente para não serem facilmente removidos no manuseio, e não conferirem alterações no gosto e *flavour* dos produtos. (CHIEN et al., 2007; AIDER, 2010). Além das características qualitativas, essa habilidade da quitosana em formar películas semipermeáveis sobre produtos vegetais, in natura, tem contribuído no aumento da vida de prateleira. (BOTREL et al., 2007) A comprovada atividade fungistática desse polímero, o torna uma alternativa potencial no controle de podridões pós-colheita de frutas. Camili *et al.* (2007) utilizaram a quitosana no recobrimento da uva “Itália”, verificando que esta suprimiu o crescimento de *Botrytis cinerea*. Chien *et al.* (2007) avaliaram os efeitos de revestimento comestível da quitosana na qualidade e vida de prateleira de fatias de manga. Santos (2012) observou a ação combinada de quitosana e óleo essencial de *Origanum vulgare* no controle de *R. stolonifer* e *A. niger* em uvas.

2.3.2 Óleos Essenciais

Óleos essenciais são compostos orgânicos de estrutura química heterogênea que se apresentam em certos gêneros de plantas superiores e inferiores, bem como em micro-organismos. São líquidos de consistência viscosa e podem ou não exalar odor (SANTOS, 2011). Também conhecidos como óleos etéreos, óleos voláteis ou simplesmente essências, são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes da planta, através da destilação por arraste com vapor d’água.

Originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanoides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (BAJPAI et al., 2008).

Podem apresentar uma mistura de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo que dois ou três compostos destes podem ser denominados majoritários,

uma vez que se apresentam em altas concentrações (20 a 70%). Em sua maioria, tais compostos majoritários são responsáveis pelas atividades e propriedades biológicas do óleo, que junto a uma baixa toxicidade para humanos, tem viabilizado o uso dos óleos, principalmente pelas indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosméticas e de alimentos, particularmente, com a exploração de suas propriedades bactericidas, fungicidas, virucida, parasiticida e inseticida (BAKKALI et al., 2008).

A utilização da bioatividade antimicrobiana e/ou elicitoras de defesa com compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleos essenciais de plantas medicinais, constitui-se em mais uma forma potencial para controle de fungos e bactérias patogênicas (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005). Os óleos essenciais têm se apresentado, especialmente, com um potencial uso no controle do crescimento de fungos fitopatogênicos em frutos, revelando destacáveis resultados (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

Os óleos essenciais têm revelado o potencial das plantas aromáticas e medicinais conhecidas, tanto por sua ação fungitóxica direta, fungistática, inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com aspectos de elicitores (OOTANI, 2013). Acredita-se, que dentre os possíveis mecanismos que utilizam para agir como antimicrobiano seja pela presença em sua constituição de compostos fenólicos, os quais alterariam a bicamada lipídica da membrana celular microbiana, aumentando sua permeabilidade, com posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, ou ainda por causar danos em seus sistemas enzimáticos (TURINA et al., 2006).

Os compostos lipofílicos presentes nos óleos essenciais são absorvidos com eficiência pelas células fúngicas, uma vez que o micélio fúngico apresenta larga natureza lipofílica, aliado à grande área relativa superficial em comparação ao seu volume (REGNIER et al, 2008). O mecanismo subjacente à ação antifúngica de óleos essenciais funciona como interruptor entre a fase vegetativa e reprodutiva do desenvolvimento fúngico, já que são citados por causar impacto negativo na esporulação, dado ao impedimento do desenvolvimento micelial e da percepção de diferentes sinais fisiológicos envolvidos na síntese de moléculas do funcionamento da forma vegetativa, com vista ao desenvolvimento da forma reprodutiva. Em consequência da supressão da produção esporica, resultade da exposição ao óleo essencial, ocorre limitação da propagação do patógeno, diminuindo a liberação de esporos ao ambiente (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

2.3.2.1 Óleo Essencial de *Mentha Piperita* L.

Mentha piperita L. (menta, hortelã-pimenta ou peppermint) é um híbrido natural entre a *M. aquatica* e a *M. spicata*, pertencente à família Lamiaceae, e tem sido considerada como uma das espécies mais exploradas por produzir compostos terpênicos. Trata-se de uma erva aromática de haste ramosa e quadrangular, verde ou roxo-purpúrea, juntamente com os ramos, e é cultivada em larga escala em regiões temperadas e tropical para a produção do seu óleo essencial. No Brasil, seu cultivo é difundido em todas as regiões (SOUZA, 2006).

Apresenta várias implicações industriais, como em produtos de higiene bucal, flavorizantes, aromatizantes de alimentos e bebidas, em perfumarias, confeitarias e produtos farmacêuticos (DOMIJAN et al, 2005).

O principal produto da *Mentha* é o seu óleo essencial, não tóxico a humanos (FREIRE, 2006) e tem sido relatado por possuir atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, sendo esta atividade associada principalmente aos compostos majoritários mentol, mentona, acetato de metila, iso-mentona (SINGH et al., 2011).

Tyagi e Malik (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. piperita* L. contra cinco cepas de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e relataram inibição bacteriana devida ao óleo, bem como frente a cinco cepas fúngicas (*Penicillium digitatum*, *A. flavus*, *A. niger*, *Mucor spp.*, *Fusarium oxysporum*) e leveduras (*Candida albicans* e *Saccharomyces spp.*), observando uma inibição quase completa. Skrinjar et al. (2009) apontam o óleo de *M. piperita* L. como causa inibitória de crescimento micelial radial e da inibição da produção de aflotoxina por *Aspergillus spp.*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DE ESTUDO

O desenho de estudo do presente trabalho caracteriza-se como analítico experimental de abordagem quantitativa.

3.2 OBTENÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

O resíduo industrial do camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, foi obtido na empresa Aquamaris Aquacultura Ltda®, localizada no município de João Pessoa-PB, sendo transportados em caixas isotérmicas ao Laboratório de Extração do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

Os resíduos obtidos foram selecionados, distribuídos em bandejas de alumínio e submetidos à secagem em estufa dotada de circulação de ar, a uma temperatura de 70°C por 18 horas. Após a retirada, foram deixados em temperatura ambiente, e transformados em farinha por meio de moagem em triturador elétrico. Para promover a desmineralização do resíduo moído, cerca de 250 g da farinha foi submetida inicialmente a imersão em 2000 mL de solução de HCl a 5%, sob agitação eventual durante 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida, o material resultante deste processo foi filtrado e lavado diversas vezes com água destilada para eliminação dos sais de cálcio. O resíduo desmineralizado foi submetido a um tratamento alcalino com 500 mL de solução NaOH 50%, sob agitação constante a 55 °C durante duas horas, de modo a ser desproteínizado. Após este período, o material quitinoso foi lavado com água destilada até a obtenção de pH neutro e seco em estufa a 45 °C por 18 horas.

Para desacetilação da quitina, o material foi submetido ao contato com solução de NaOH 50% a uma temperatura de 85°C por seis horas sob agitação constante. Após este procedimento, a amostra foi lavada seguidamente com água destilada até obtenção de pH neutro, sendo em seguida seca em estufa a 45 °C por 18 horas (DE ASSIS, 2009).

3.2.2 Obtenção dos óleos essenciais

O OE de *M. piperita* L. (Hortelã-pimenta) foi adquirido comercialmente na empresa Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brasil), e os seus parâmetros de qualidade foram descritos em laudo técnico emitido pelo fornecedor.

3.2.3 Obtenção dos micro-organismos teste

Como micro-organismos teste foram utilizados cepas de *A. flavus* URM 4540, *A. niger* URM 5842, *R. stolonifer* URM 3728, *B. cinerea* URM 2802 e *P. expansum* URM 3396 obtidos da Coleção de Culturas Micoteca URM (Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco). Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizados repiques das culturas estoque subcultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud (Himedia, India) incubados a 25-28 °C, durante sete dias para suficiente esporulação. Os esporos fúngicos foram colhidos através da adição de solução salina (NaCl 0,85 g/100 mL) estéril no meio de crescimento fúngico, e a suspensão obtida foi filtrada em tripla camada de gaze estéril para retenção dos fragmentos de hifas. Em seguida, o número de esporos presentes na suspensão foi determinado através de contagem em câmara de Newbauer. A concentração obtida de esporos foi ajustada com solução salina estéril para prover um inóculo fúngico de aproximadamente 10^6 esporos/mL (RASOOLI e ABYANETH, 2004; RASOOLI e OWLIA, 2005).

3.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A avaliação fitoquímica do OE de *M. piperita* L. foi realizada no Núcleo de Caracterização e Análise da UFPB, Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA). A composição fitoquímica do OE foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS), modelo QP2010 Ultra (SHIMADZU, Kioto, Japão), com detector seletivo de massa, injetor capilar Split/Splitless e controlador de fluxo e pressão automático, operando com energia de 0,70 eV. Foi usada coluna capilar OV (diâmetro interno - filme - 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 mm) com as seguintes especificações: temperatura de injeção - 250 °C e 290 °C no detector, fluxo de gás (hélio) na coluna - 1,0 mL min⁻¹, velocidade linear - 36,4 cm s⁻¹, fluxo total - 302,4 mL min⁻¹, pressão de 57 kPa, temperatura inicial da coluna - 60 °C (por 2 min.) até 180 °C (por 1 min) a 4 °C min⁻¹, e 180 até 260 °C a 10 °C min⁻¹ (por 10 min). A concentração dos seus componentes foi calculada usando as áreas de pico individuais para cada uma das substâncias. Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation acoplado com a biblioteca de espectros de massa NIST/2002 (WANG; CHEN; CHANG, 2005).

3.4 PRODUÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL

As soluções de quitosana (QUI) foram obtidas por dissolução do polímero (16 mg/mL) em ácido acético (1 mL/100 mL) por 24 horas em temperatura ambiente sob agitação (120 rpm) (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Em seguida, foram feitas sucessivas diluições seriadas (1:1) em caldo Sabouraud (Himedia, Inda), obtendo-se soluções com diferentes concentrações (8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/mL). As soluções de óleo essencial (OE) foram obtidas por dissolução do material (10 µL/mL) em caldo Sabouraud adicionado de ágar bacteriológico [0,15 g/100 mL (Himedia, India)] como agente estabilizador da solução (BENNIS et al., 2004), sendo em seguida feitas sucessivas diluições (1:1) no mesmo caldo, obtendo-se soluções com diferentes concentrações (10; 5; 2,5; 1,25; 0,0625; 0,3 µL/mL).

Quando da aplicação combinada de QUI e OE, inicialmente foi realizada a dissolução da QUI (8,0, 4,0, 2,0 mg/mL) em ácido acético (1 mL/100 mL) sob constante agitação (120 rpm) por seis horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionadas as diferentes concentrações de OE (5; 2,5; 1,25 µL/mL), seguindo-se o processo de agitação por 18 horas adicionais a temperatura ambiente. Nos ensaios de aplicação da solução formada pela combinação de QUI e OE como filmes em frutos, foi adicionado glicerol (2 mL/100 mL) como agente plastificante no mesmo momento da incorporação de OE a solução filme (OJAGH et al., 2010).

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM

A CIM da QUI e do OE foi determinada através da técnica de diluição em caldo. Inicialmente, 1 mL da suspensão fúngica foi inoculado em 4 mL de caldo Sabouraud com concentração ajustada para 10 mL, em seguida, foi adicionado 5 mL da solução com diferentes concentrações de QUI ou do OE. O sistema foi incubado a 25-28 °C por 72 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração (mais alta diluição) de QUI e do OE que não apresentou crescimento fúngico visível foi considerada como a CIM (SHARMA e TRIPATHI, 2007).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de determinação da CIM do óleo e da quitosana foram escolhidas as diferentes concentrações de QUI e OE (QUI 8 mg/mL+ OE 5 µL/mL; QUI 8 mg/mL + OE 2,5 µL/mL; QUI 8 mg/mL + OE 1,25 µL/mL; QUI 4 mg/mL + OE 5 µL/mL; QUI 4 mg/mL + OE 2,5µL/mL; QUI 4 mg/mL + OE 1,25µL/mL; QUI 2

mg/mL + OE 5 µL/mL; QUI 2 mg/mL + OE 2,5µL/mL; QUI 2 mg/mL + OE 1,25µL/mL) que foram aplicadas em combinação nos ensaios de influência sobre o crescimento micelial radial e germinação de esporos.

3.6 INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL FÚNGICO

A avaliação da inibição do crescimento micelial radial foi determinada utilizando-se a técnica do envenenamento do substrato de crescimento (diluição em meio sólido). Para tal, foi realizada a medida diária do crescimento micelial radial em ágar Sabouraud adicionado das diferentes concentrações de QUI ou de OE. Para a execução da técnica, inicialmente foi tomada um disco de 2 mm de diâmetro de uma cultura de cada cepa fúngica com crescimento de 10 dias em ágar Sabouraud a 25-28 °C, que foi colocada no centro de uma placa de Petri esteril com ágar Sabouraud adicionado de QUI e OE nas concentrações inibitórias e subinibitórias anteriormente descritas. O sistema foi incubado a 25-28°C por 14 dias. Em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4, 6, 9, 12 e 14 dias) de incubação, o crescimento micelial radial da colônia fúngica foi medido e o resultado expresso em milímetros (mm) (ADAM et al.,1998; DAFERERA et al., 2003). O controle incluído neste ensaio foi a observação do crescimento micelial radial da cepa fúngica em ágar Sabouraud sem adição de QUI e de OE.

3.7 INFLUÊNCIA SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESPOROS FÚNGICOS

Alíquotas de 0,1 mL de cada solução contendo diferentes concentrações de QUI e OE foram misturadas com 0,1 mL da suspensão de esporos fúngicos (10^6 esporos/mL) obtidos de culturas com dez dias de crescimento em ágar Sabouraud a 25-28°C. Em seguida, 0,1 mL do sistema foi colocado no centro de lâminas de vidro estéreis, sendo em seguida incubadas em câmara úmida a 25-28°C por 24 horas. Após este período, cada lâmina foi fixada com o corante azul lactofenol algodão e observada sobre microscópio óptico para germinação do esporo. Aproximadamente 200 esporos de cada lâmina foram contados. A efetividade da QUI na inibição da germinação dos esporos fúngicos foi observada através da comparação do número de esporos germinados nas soluções adicionadas de QUI e OE em comparação com o número de esporos germinados no experimento controle, onde a solução destes agentes foi substituída por caldo Sabouraud (FENG E ZENG, 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO E RENDIMENTO DA QUITINA E QUITOSANA

Neste estudo, ao realizar o cálculo do rendimento da utilização do resíduo úmido das carapaças de camarão, e a sua transformação em farinha após secagem, obteve-se 23,7% de rendimento. Hennig (2009) obteve 14, 1% de rendimento da farinha do resíduo de camarão *Penaeus brasiliensis*, valor inferior ao apresentado nesse estudo. Andrade (2012) e Paiva et al. (2004) obtiveram rendimento percentual da farinha do resíduo de 21,31% e 23,9%, respectivamente, corroborando com os resultados aqui obtidos.

O aproveitamento dos resíduos pode ser direcionado para várias modalidades, como na elaboração de rações animais (NUNES, 2011), na fabricação de *snacks* e de aromas, de produtos químicos e, ainda, no aproveitamento de produtos com propriedades funcionais ou bioativas (CAPDEVILLE et al., 2002; CHOI et al., 2002; NUNES, 2011).

Considerando a utilização da farinha para a produção de QUI, os resultados do rendimento dos valores médios de quitina e quitosana estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento (média e desvio padrão) da quitina e quitosana obtidas a partir do resíduo industrial do camarão *L. vannamei*.

	Peso (g)	Rendimento (%)
Farinha do Resíduo	110	100
Quitina	20,83±0,21	18,94±0,04
Quitosana	16,53±0,15	15,03±0,04

Considerando o peso da farinha seca, foram obtidos valores médios de rendimento de quitina e de quitosana em torno de 18,9% e de 15%, respectivamente. Estes resultados apresentam-se inferiores aos obtidos por De Assis (2009), quando comparados ao rendimento da quitina (21%), e semelhantes quanto ao rendimento da quitosana (15,5%), em estudo com resíduos de camarão *L. vannamei*. Moura (2008) encontrou rendimento final de 9,4%, os quais são valores inferiores aos achados do presente estudo; enquanto Battisti e Campana Filho (2008) estudando o rendimento da quitina oriunda de resíduos do camarão *Macrobrachium rosenbergii*, encontraram valores semelhantes aos obtidos neste estudo (19,4%).

O crescimento da carcinicultura no Brasil e nos demais países tropicais e subtropicais em desenvolvimento tem ganhado crescimento significativo nos últimos anos. Segundo Sampaio e Costa (2003), a carnicultura tem forte impacto social-econômico regional, principalmente na região nordeste do Brasil. A carnicultura nordestina responde por 90 a 95% da produção nacional, que em 2004 chegou a 75.000 toneladas segundo dados da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC, 2005), e conta com um imenso potencial de expansão em função de áreas disponíveis, além de temperatura média anual de 27°C, ecossistema privilegiado, salinidade adequada, água rica em alimentos provenientes de manguezais, terras impermeáveis, planas e ventilação apropriada (CB, 2010; SILVEIRA & ROCZANSKI, 2005).

Associado ao alto consumo e produção de camarões no Brasil e no mundo está o problema ambiental da geração de resíduos, uma vez que cerca de 40% da massa total industrializada do camarão é descartada na forma de resíduo sólido (carapaça, conteúdo protéico, etc.) durante o processamento do crustáceo, o que no Brasil promove o acúmulo de milhares de toneladas de resíduos por ano (HENNIG, 2009)

Um grande desafio tem sido encontrado na realocação desses resíduos a fim de reduzir a poluição em níveis ambientais. Em contrapartida, é grande o interesse e desenvolvimento de alternativas por parte da comunidade científica no reaproveitamento desse material (ASSIS, 2008), dada a proveitosa obtenção da matéria-prima nutricionalmente rica e de ampla utilização por parte da indústria.

No presente estudo, o considerável rendimento da quitosana sugere também a utilização dos resíduos para outras finalidades, a exemplo da produção de géis, reduzindo de maneira significativa os custos do processo e contribuindo na prevenção de seu lançamento no ambiente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* L.

Os óleos essenciais são constituídos de uma complexa mistura de hidrocarbonetos, álcoois e compostos aromáticos, existentes em todo o tecido das plantas, comumente concentradas na casca, caule, frutos, folhas e sementes. Destacam-se as substâncias terpênicas, constituídas de moléculas de dez e de quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos) e eventualmente de fenilpropanoides (SANTOS, 2011).

O óleo essencial é o principal produto das plantas do gênero *Mentha*, produzido e armazenado em tricomas glandulares peltados, os quais estão presentes principalmente em folhas e flores e em menores densidades nos caules (DESCHAMPS et al, 2012).

A composição fitoquímica dos óleos essenciais podem apresentar variações na quantidade e nos tipos de compostos encontrados. Isso se deve às mais variadas condições, tais como a diversidade genética, o habitat, a sazonalidade, fotoperiodismo e armazenamento (FREIRE, 2006; VALMORBIDA, 2006; SANTOS, 2011). Os constituintes do óleo essencial variam de acordo com a localização geográfica, uso de agroquímicos e procedimento de extração (KUMAR et al., 2012)

Foram identificados 36 componentes no óleo essencial de *M. piperita* (Tabela 2), sendo os compostos majoritários mentol (44,67%), mentanona (20,69%), e neo-mental (6,25%). O mentol e a mentona são compostos monoterpênicos, que pertencem ao subgrupo dos álcoois e cetona, e têm ganhado destaque em vários estudos pela sua atividade antimicrobiana, variando de acordo com as cepas, bem como com a origem do óleo (SANTOS, 2011).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *M. piperita* L.

Constituintes	
	%
3 Hexenol	0,04
α -pineno	0,17
Trans 3 – Metilciclohexanol	0,03
3 metil-ciclohexanona	0,01
Sabineno	0,16
β -Pineno	0,40
Mirceno	0,10
Etilhexanol	0,20
Para-cimeno	0,17
Limoneno	2,00
1-8 cineol	0,99
β -Ocimeno	0,01
Z-Hidrato de Sabineno	0,09
1-Octanol	0,04
β -Linalol	0,12
Cis-carveol	0,07
α -Tujhol	0,02
Isopulegol	1,46
Menthona	20,7

Trans-3 Pinanona	0,01
1-2 Ciclohexano	16,1
Menthol	44,7
Ylangeno	1,29
Copaeno	0,67
Ciclobutal	0,03
Cariofileno	0,02
B-Cubeneno	0,02
Muuroleno <epsilon>	1,70
1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-m Amorphene <epsilon>	1,48
Oxido de cariofileno	0,03
Nonacosane <n>	0,25
Neo-Menthil	6,25
α -ciclohexanol	0,05
Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-met	0,07
Neo-menthil	0,02
Triacotano	0,08

Esta variedade de compostos químicos presentes nos óleos essenciais como os terpenos, terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos e os oxigenados derivados) possuem baixo peso molecular, são altamente lipofílicos, e por isso têm facilidade de atravessar membranas celulares e induzir respostas biológicas (CHAO et al., 2005).

Valeriano et al. (2012), ao quantificar e qualificar os constituintes do óleo de *M. piperita* L., encontraram 17 compostos, sendo o menthol (32,33%) o componente em maior quantidade. Kumar et al. (2012), avaliando a composição do óleo de *M. piperita* L., também encontraram como componentes majoritários o menthol (26,53%) e a menthona (25,83%), e descrevem que esses dois fitocompostos são os responsáveis pela propriedade antimicrobiana do óleo essencial. Edris & Farrag (2003), avaliando os vapores de óleos essenciais de *Mentha*, junto ao óleo de manjeriço doce (*Ocimum basilicum* L.), considerou o menthol como fitoconstituente responsável pelas propriedades antifúngicas dos óleos essenciais de *Mentha*.

Tavish & Harris (2002) destacaram que, apesar de serem conhecidos mais de 200 componentes presentes nos óleos essenciais de espécies do gênero *Mentha*, os principais componentes são isomentol, neomentol, isomentona, farneseno, metil-acetato, neomentil-acetato, piperitona, limoneno, 1,8-cineol, 3-octano, beta-pineno, alfa-pineno, pulegona; entretanto, o menthol, a menthona e mentofurano são citados como sendo de maior importância, inclusive pelo apreciável valor econômico.

4.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os valores da CIM da QUI e do OE de *M. piperita* L. são apresentados na Tabela 3 e na Tabela 4, respectivamente. A QUI apresentou valores de 8 mg/mL como CIM frente a todos os fungos estudados (*A. flavus*, *A.niger*, *P. expansum*, *R. stolonifer*, *B.cinerea*).

Santos et al. (2012) obtiveram valores de CIM de quitosana comercial com médio grau de desacetilação de 10 mg/mL frente a cepas de *A. niger* e *R. stolonifer*, resultados superiores aos obtidos no presente estudo. Pedro et al. (2012) em seus estudos com derivados da quitosana e quitosana desacetilada obtiveram valores de CIM de 4 mg/mL frente a cepas de *A. flavus*, resultados inferiores aos obtidos neste estudo.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) das cepas reveladoras de atividade em função das concentrações de quitosana aplicadas.

Cepa reveladora de atividade	CIM da quitosana
<i>A. flavus</i> URM 4540	8 mg/mL
<i>A. niger</i> URM 5842	8 mg/mL
<i>R. stolonifer</i> URM 3728	8 mg/mL
<i>B.s cinerea</i> URM 2802	8 mg/mL
<i>P. expansum</i> URM 3396	8 mg/mL

Estudos variados têm relatado a atividade antifúngica da QUI frente a *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger*, *A. flavus*, *P. expansum*, (LI e YU, 2001; SEBTI et al., 2005; BOTELHO et al. 2010; VARGAS et al., 2006; CUERO et al, 1991). OLIVEIRA JÚNIOR et al (2006) avaliando quatro tipos de quitosana em diferentes concentrações, observaram um forte efeito antifúngico frente às cepas de *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer* e *A. alternata*.

O mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana ainda não está bem elucidado. Quatro são os mecanismos possíveis; o primeiro acredita que há uma interação entre as cargas positivas do grupamento amino da cadeia polimérica de quitosana com as cargas negativas dos resíduos das macromoléculas (lipopolissacarídeos e proteínas) na membrana da célula, causando interferência nas trocas de nutrientes entre o meio extra e o intracelular. Tais cargas também competem com o cálcio pelos sítios eletronegativos das membranas microbianas comprometendo a integridade da mesma e como consequência libertando o material

intracelular e resultando em morte da célula (MÖLLER et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2005, MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010). O segundo mecanismo propõe a atuação da quitosana como agente quelante, criando compostos utilizando traços de metais essenciais a célula microbiana (ROLLER e COVILL, 1999). O terceiro sugere que a quitosana de baixo peso molecular penetra no núcleo celular e interage com o DNA, interferindo na síntese de RNA-mensageiro, impedindo a síntese proteica e a ação de várias enzimas (RABEA et al., 2003, MARTINEZ- CAMACHO et al., 2010). A quitosana ainda pode formar uma camada impermeável ao redor da célula, causando o bloqueio do transporte intracelular (EATON et al, 2008).

A CIM do OE de *M. piperita* L. foi de 5,0 µL/mL (Tabela 4), frente a todas as espécies fúngicas testadas. A ação antimicrobiana, especialmente antifúngica, do óleo essencial de *M. piperita*, por sua riqueza em monoterpenos, tem sido explicada pelo efeito tóxico na estrutura e função da membrana celular. Dadas as suas características lipofílicas, os monoterpenos se deslocam, preferencialmente, em direção às estruturas de membrana, causando a expansão da membrana, o aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, desordenando as proteínas embebidas na membrana, inibindo a respiração e alterando o processo de transporte de íons (TROMBETTA et al., 2005). Sendo assim, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento das funções, como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) das cepas reveladoras de atividade em função das concentrações de óleo essencial de *M. piperita* L.

Óleo essencial	<i>A. flavus</i> URM 4540	<i>A. niger</i> URM 5842	<i>R.stolonifer</i> URM 3728	<i>B. cinerea</i> URM 2802	<i>P.expansum</i> URM 3396
CIM do óleo essencial	5,0 µL/MI	5,0 µL/mL	5,0 µL/MI	5,0 µL/mL	5,0 µL/mL

SAHARKIZ et al. (2012), encontraram CIM de 4,0 µL/mL para o óleo de *M. piperita* L. frente à cepa de *A. flavus*, resultados inferiores ao presente trabalho. SAXENA et al.

(2012), ao estudarem o efeito antifúngico do óleo sobre *Trichosporon ovoides*, encontraram CIM de 12,5 µL/mL, resultados superiores aos obtidos nesse estudo.

É possível que a divergência entre os valores de CIM desse estudo com os estudos supracitados se deva à variação da composição entre os óleos essenciais estudados, o que pode ocorrer em decorrência da adoção de diferentes métodos de extração da substância da planta produtora, pelas metodologias adotadas na determinação dos valores de CIM, bem como por diferenças na sensibilidade das cepas teste.

Com base na determinação dos valores de CIM da quitosana em 8 mg/mL e na CIM do óleo em 5,0 µL/mL, foram definidas as combinações dos dois agentes, utilizando-se a concentração inibitória e as subinibitórias a serem utilizadas nos demais testes. Definiu-se a CIM, (8 mg/mL de quitosana + 5µL/mL de óleo essencial), e, como subinibitórias, 50% da CIM (4 mg/mL de quitosana + 2,5µL/mL de óleo essencial) e 25% da CIM (2 mg/mL de quitosana + 1,25µL/mL de óleo essencial) para realização dos ensaios de crescimento micelial radial e germinação de esporos fúngicos.

4.5 INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL FÚNGICO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Utilizando as combinações inibitórias e subinibitórias de QUI e do OE de *M. piperita* L., obteve-se um elevado percentual de inibição (>96%) do crescimento micelial em meio sólido em todas as espécies fúngicas avaliadas, durante 14 dias de ensaio, em relação ao experimento controle (Tab 5 a Tab 9).

A inibição da germinação esporica, em todos os fungos estudados também alcançou valores expressivos frente a todas as concentrações de QUI e de OE (Tab 10). Houve uma variação de 90% a 100%, quanto ao percentual de inibição da germinação de esporos, sendo o menor correspondente à combinação das menores concentrações de QUI e de OE. *A. niger* apresentou maior variação no percentual de inibição, enquanto frente ao *R. stolonifer* houve a mais destacável inibição. Tem sido sugerida na literatura que a inibição da germinação esporica exercida pela QUI e OE deve-se à interação dos componentes com a parede celular do esporo (PLASCENCIA-JATOMEA et al., 2003; SHARMA e TRIPATHI, 2007).

Tabela 5. Inibição do crescimento micelial radial do *A. flavus* URM 4540, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de *M. piperita* L.

COMBINAÇÃO DE QUI + MP	Percentual de Inibição (%)					
	Dias					
	2	4	6	9	12	14
QUI (8 mg/mL) +MP(5µL/mL)	99,3	99,2	99,2	97,0	96,9	96,8
QUI (8 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,3	97,2	97,6	97,4	96,8	96,8
QUI (8 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,2	97,4	97,3	97,2	96,3	96,0
QUI (4 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,1	97,4	97,2	97,0	97,0	96,9
QUI (4 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,4	97,5	97,3	97,5	97,1	96,9
QUI (4 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,4	97,1	97,2	97,2	97,1	96,9
QUI (2 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,4	97,0	97,1	96,8	96,8	96,7
QUI (2 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,1	97,3	97,2	97,0	96,8	96,9
QUI (2 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,4	97,2	97,0	97,0	96,9	96,6

Resultados expressos como percentual de inibição do crescimento micelial radial em relação ao experimento controle (QUI 0 mg/mL + MP 0 µL/mL). QUI: quitosana; MP: óleo essencial de *M. piperita* L.

Tabela 6. Inibição do crescimento micelial radial do *A. niger* URM 5842, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de *M. piperita* L.

COMBINAÇÃO DE QUI + MP	Percentual de Inibição (%)					
	Dias					
	2	4	6	9	12	14
QUI (8 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,7	97,7	97,6	97,6	97,6	97,5
QUI (8 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	98,0	97,8	97,9	97,6	97,8	97,8
QUI (8 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,1	97,2	97,2	97,1	96,9	96,2
QUI (4 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,9	97,9	97,7	98,0	97,0	97,1
QUI (4 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,8	97,6	97,5	97,3	97,2	97,0
QUI (4 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,2	97,1	97,1	97,2	96,9	96,4
QUI (2 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,3	97,8	97,8	97,0	97,2	97,0

QUI (2 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,7	97,7	97,6	97,3	97,1	97,2
QUI (2 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,3	97,1	97,4	96,9	96,7	96,7

Resultados expressos como percentual de inibição do crescimento micelial radial em relação ao experimento controle (QUI 0 mg/mL + MP 0 µL/mL). QUI: quitosana; MP: óleo essencial de *M. piperita* L.

Tabela 7. Inibição do crescimento micelial radial do *R. stolonifer* URM 3728, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de *M. piperita* L.

COMBINAÇÃO DE QUI + MP	Percentual de Inibição (%)					
	Dias					
	2	4	6	9	12	14
QUI (8 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,5	97,5	97,4	97,5	97,1	97,2
QUI (8 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,2	97,2	97,1	97,0	97,0	97,2
QUI (8 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,7	97,7	97,3	97,8	97,2	97,2
QUI (4 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,1	97,1	97,1	97,0	97,3	96,9
QUI (4 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,2	97,2	97,0	96,9	97,1	97,0
QUI (4 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,3	97,3	97,5	97,5	97,0	97,1
QUI (2 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,5	97,5	97,4	97,7	97,7	97,1
QUI (2 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,1	97,1	97,3	97,4	97,5	97,2
QUI (2 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,4	97,4	96,9	97,3	97,1	97,0

Resultados expressos como percentual de inibição do crescimento micelial radial em relação ao experimento controle (QUI 0 mg/mL + MP 0 µL/mL). QUI: quitosana; MP: óleo essencial de *M. piperita* L.

Tabela 8. Inibição do crescimento micelial radial do *B. cinerea* URM 2802, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de *M. piperita* L.

COMBINAÇÃO DE QUI + MP	Percentual de Inibição (%)					
	Dias					
	2	4	6	9	12	14

	2	4	6	9	12	14
QUI (8 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,1	97,2	97,0	97,0	96,9	96,8
QUI (8 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,2	97,3	97,1	97,0	96,9	96,8
QUI (8 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,2	97,4	97,2	97,1	97,0	96,7
QUI (4 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,2	97,0	97,0	97,1	96,9	96,6
QUI (4 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,2	97,3	97,5	97,4	97,4	97,0
QUI (4 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,1	97,0	96,8	96,8	96,6	96,5
QUI (2 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,3	97,2	97,3	97,1	96,9	96,8
QUI (2 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,4	97,4	97,5	97,3	97,4	97,0
QUI (2 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,4	97,1	96,9	96,9	96,4	96,4

Resultados expressos como percentual de inibição do crescimento micelial radial em relação ao experimento controle (QUI 0 mg/mL + MP 0 µL/mL). QUI: quitosana; MP: óleo essencial de *M. piperita* L.

Tabela 9. Inibição do crescimento micelial radial do *P. expansum* URM 3396, em meio sólido ao longo de 14 dias de exposição à diferentes combinações de quitosana e óleo essencial de *M. piperita* L.

COMBINAÇÃO DE QUI + MP	Percentual de Inibição (%)					
	Dias					
	2	4	6	9	12	14
QUI (8 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,2	97,1	97,0	97,2	97,2	97,1
QUI (8 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,1	97,1	97,0	97,1	97,1	96,8
QUI (8 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,2	97,2	97,1	97,3	97,1	97,2
QUI (4 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,5	97,1	97,6	97,1	97,2	97,2
QUI (4 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,2	97,1	97,1	97,1	97,1	96,9
QUI (4 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	97,2	97,1	97,5	97,1	96,4	96,7
QUI (2 mg/mL) +MP(5µL/mL)	97,3	97,1	97,1	97,2	97,2	97,4
QUI (2 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	97,3	97,0	97,0	97,4	96,8	97,0

QUI (2 mg/mL) +MP(1,25µL/mL) 97,2 97,1 96,9 96,3 96,5 96,6

Resultados expressos como percentual de inibição do crescimento micelial radial em relação ao experimento controle (QUI 0 mg/mL + MP 0 µL/mL). QUI: quitosana; MP: óleo essencial de *M. piperita* L.

Tabela 10. Inibição da germinação esporica de *A. flavus* (URM 4540), *A. niger* (URM 5842), *R. stolonifer* (URM 3728), *B. cinerea* (URM 2802) e *P. expansum* (URM 3396) quando expostos a diferentes combinações de quitosana e óleo de *M. piperita* L.

COMBINAÇÃO DE QUI + MP	Percentual de Inibição (%)				
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. expansum</i>
QUI (8 mg/mL) +MP(5µL/mL)	100	100	100	100	100
QUI (8 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	98	99	100	99	100
QUI (8 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	96	98	100	99	100
QUI (4 mg/mL) +MP(5µL/mL)	96	98	100	98	100
QUI (4 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	94	98	100	98	100
QUI (4 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	94	96	99	98	99
QUI (2 mg/mL) +MP(5µL/mL)	96	95	98	97	99
QUI (2 mg/mL) +MP(2,5µL/mL)	94	93	97	96	98
QUI (2 mg/mL) +MP(1,25µL/mL)	91	90	92	93	98

Resultados expressos como percentual de inibição da germinação esporica em relação ao experimento controle (QUI 0 mg/mL + MP 0 µL/mL). QUI: quitosana; MP: óleo essencial de *M. piperita* L.

O destacável efeito antifúngico observado em consequência da aplicação conjunta de QUI e OE a concentrações subinibitórias sugere um efeito antifúngico potencializado resultante da aplicação combinada destes compostos, quando considerado o rápido e constante efeito inibitório estabelecido frente às estruturas vegetativas e de reprodução das cepas fúngicas teste.

Há forte evidência que o crescimento micelial fúngico pode ser inibido até completamente ou retardado quando quitosana é adicionada ao meio de cultura de fungos. (OLIVEIRA JÚNIOR, 2006).

LIU et al. (2007), revelaram que houve inibição total do crescimento micelial de *B. cinerea* a 5% de concentração de a três dias de incubação. BOTELHO et al. (2010) verificaram o efeito *in vitro* de quitosana no crescimento micelial de *Penicillium* sp. e observaram que, aos seis dias após a incubação, a concentração de 0,016% reduziu o crescimento do fungo em 34,2%, comparado com a o experimento controle.

Estudando o efeito *in vitro* da quitosana, El Ghaouth et al (1992) observaram diminuição marcada do crescimento micelial dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer* com grande efeito. Os autores também analisaram a viabilidade dos esporos fúngicos e a germinação dos mesmos fungos e observaram que, em concentrações de 0,75mg/mL, houve uma considerável inibição. Outros estudos têm relatado a eficácia da QUI na inibição do crescimento micelial e da germinação dos esporos de fungos patógenos pós-colheita (HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008; LI et al., 2009).

Estudos *in vitro* têm revelado o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais (TAMPIERI et al, 2005) e o elevado poder de inibição do crescimento de fungos fitopatógenos pós-colheita (XING et al., 2012; OMIDBEYGI et al., 2007). Magro et al. (2006), testando o extrato de *M. piperita* em concentração de 1,5 g/mL frente a algumas espécies fúngicas, obteve 50 % de inibição frente a *A. niger* e *Penicillium* sp.

Freire (2006) observou o elevado efeito antifúngico de OE de *M. piperita* L. (0,1 e 0,2 mL/100 mL) sobre diversos fungos (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceous*, *A. glaucus*, *C. musae*, *C. gloesporioides*, *F. semitectum* e *F. oxysporum*), sendo os constituintes menthona, neo-menthol e carvona descritos como os principais agentes fungitóxicos do óleo essencial.

Pereira et al. (2006), utilizando óleo essencial de *Mentha*, observaram inibição do crescimento micelial de *A. niger* e *A. flavus*. Alguns autores observaram em estudos *in vitro* que a adição de óleos essenciais à matriz de quitosana melhorou sua propriedade antimicrobiana (CHI; ZINANOVIC; PENFIELD, 2006; SÁNCHEZ-GONZÁLES et al. 2010).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelam que a quitosana de camarão e óleo essencial de *Mentha piperita* L., quando aplicados em combinação em diferentes concentrações subinibitórias, apresentam destacável capacidade “*in vitro*” de inibição dos fungos patógenos pós-colheita *A.flavus*, *A. niger*, *R. stolonifer*, *B.cinerea* e *P.expansum*. Estes achados revelam a potencialidade da aplicação combinada de QUI e OE em concentrações subinibitórias no controle do crescimento e sobrevivência de patógenos fúngicos pós-colheita, podendo surgir como alternativa aos agentes antifúngicos sintéticos atualmente aplicados com a finalidade de diminuir as perdas pós-colheitas decorrentes da ação de tais contaminantes biológicos.

REFERÊNCIAS

- ADAM, K.; SVROPOULOU, A. KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 46, p. 1739-1745, 1998.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. Review. **LWT- Food Science and Technology**, n. 43, p. 837-842, 2010.
- ANDRADE, J. M. S.; LIMA, M. L. P.; ASPECTOS GERAIS E MORFOLÓGICOS DE *Aspergillus flavus*. **Estudos de doenças de plantas**, 2010. Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/12/aspectos-gerais-e-morfologicos-de_13.html . Acesso em julho de 2014.
- ANDRADE, S. M. B. Eletrofição e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos. **Tese de Doutorado**: Centro de Tecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2012.
- ANSARI, M. A.; VASUDEVAN, P.; TANKON, M. RAZDAN, R. K. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha Piperita*) oil, **Bioresource Technology**, v. 71, p. 267-271, 2000.
- ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Bioconversão De Resíduos De Camarão *Litopenaeus Vannamei* (Booner, 1931) Para Produção De Biofilme De Quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. v. 9, n. 5, 2008.
- AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K. H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIANN-MEHER, M. J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as na antimicrobial agent: Syntesis, characterization an antibacterial effects. **European Polymer Journal**, n. 40, p. 1355-1361, 2004.
- AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; , COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: Aplicações Como Biomateriais. **Revista Eletrônica De Materiais E Processos**, Campina Grande, n. 24, p.27-34, 2007.
- BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; SUN, C.K. Chemical composition and inhibitory parameters of essencial oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. To control food-borne pathogenic and spoilage bactéria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 117-22, 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo essencial de Piper aduncum no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.5, p.555-7, 2004.
- BATTISTI, M.V.; CAMPANA-FILHO, S. P.; Obtenção e caracterizaçãode α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Quimica. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.

BELMONT, R. M.; MOCTEZUMA, H. E. F. Sorghum seeds treated with natural products for the control of *Fusarium thapsinum* and *Claviceps Africana*. **Manejo Integrado de Pragas**, v. 61, p. 23-30, 2001.

BENNIS, S.; CHAMI, F.; CHAMI, N.; BOUCHIKHI, T.; REMMAL, A. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 454-458, 2004.

BHASKARA REDDY, M.V. et al. Effect of preharvest chitosan sprays in post-harvest infections by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.39-51, 2000.

BOMFIM M. P.. ANTAGONISMO *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* ssp. a *Rhizopus stolonifer* em Maracujazeiro amarelo. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Vitória-ES, 2007.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A. J.; RICKLI, E. H.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R.; Quitosana no controle de *Penicillium* sp. na pós-colheita de maçãs. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.5, p.200-206, 2010.

BOTREL, D.A; SOARES, N.F.F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R.M.; FONTES, E.A.F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, n.1, p.32-38, 2007.

BOWER, C. Postharvest handling, storage, and treatment of fresh market berries. In: ZHAO, Y. **Berry fruit: value- added products for health promotion**. Boca Raton: CRC, 2007. p.262- 288.

BRUM, R. B. C. S. Efeitos de óleos essenciais no controle de fungos fitopatógenos. **Dissertação** (Mestrado em produção vegetal). Universidade Federal do Tocantins, 2012.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n.3, p. 215-221, 2007.

CANAVER, B. C. Avaliação do uso de quitosana e de fumigação para o controle de podridões em frutos da macieira (*Malus domestica Borkh.*) causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*. **Dissertação** (Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

CAPDEVILLE, G.; DE WILSON, C.L.; BEER, S.V.; AIST, J.R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested Red Delicious apple fruit. **Phytopathology**, n. 92, p. 900–908, 2002.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.

- CARRETTO, C. F. P.; ALMEIDA, R. B. A.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. against *Candida* spp. **Braz Dent Sci**, v. 13, n. 1, p. 4-9, 2010.
- CASAROLI, D., GARCIAI, D.C., MUNIZ, M.F.B., MENEZES, M.L. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de abóbora variedade Menina Brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 158-163, 2006.
- CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.
- CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.
- CB - Centro de Biociências. **Carcinicultura do Rio grande do Norte**, (2010). Disponível em: <http://www.cb.ufrn.br/> Acesso em julho de 2014.
- CÉ, N. Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para a cobertura de kiwis e morangos minimamente processados. 2009. 95 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- CENARGEN. **Fungos Relatados em plantas no Brasil**. Disponível em: <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/micbanco01a.asp>> Acesso em julho de 2014.
- CHAO, S.C.; YOUNG, D.G.; Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essential Oil Research**, v.12, n.4, p.630-49, 2000.
- CHI, S.; ZIVANOVIC, S.; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna – active compounds and sensory attributes. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 111-117, 2006.
- CHIEN, J.P.; SHEU, F.; YANG, F.H. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. **Journal of Food Engineering**, 78:225-229. 2007.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. Editora UFLA, Lavras. p. 783, 2005.
- CIRA, L. A.; HUERTA, S.; HALL, G. M.; SHIRAI, K.; Pilot scale lactic acid fermentaions of shrimp waste for chitin recovery. **Process in Biochemistry**, v. 37, p. 1359, 2002.
- CHOI, W.Y.; PARK, H.J.; AHN, D.J.; LEE, J.; LEE, C.Y. Wettability of chitosan coating solution on Fiji apple skin. **Journal of Food Science**, n.67, p.2668–2672, 2002.
- COSTA, H.; VENTURA, J. A. Doenças do morangueiro: diagnóstico e manejo. In: BALBINO, J. M. S. (Ed.). **Tecnologias para produção, colheita e pós-colheita de morangueiro**. Vitória: **Incaper**, p. 41-57, 2006.

COSTA, M. A. C.; JESUS, J. G.; FARIAS, J. G.; NOGUEIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, A. L. R.; FERRI, P. H.. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 53-65, 2008.

CUERO, R. G.; OSUJI, G.; WASHINGTON, A. N-carboxymethyl chitosaninhibition of aflatoxin production: role of zink. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 3, p. 441-444, 1991.

DAFERERA, D. J. ZIOGAS, B. N. POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection**, n. 22, p 39-44, 2003.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 528-533, 2003.

DAMASCENO, K. S. F. S. C.; ANDRADE, A. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento do resíduo de camarão. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 27, n. 2, p. 213-224, 2009.

DE ASSIS, A. S. Produção e caracterização do biofilme de quitosana como envoltório protetor de morangos. **Tese** (Doutorado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco, 88p, 2009.

DESCHAMPS, C.; MONTEIRO, R.; MACHADO, M. P.; BIZZO, H.; BIASI, L. A. Produção de biomassa e teor de *Mentha x piperita* L. em resposta a fontes e doses de nitrogênio. **Rev Bras Plantas Med. Botucatu**, v. 14, n. 1, p. 7-12, 2012.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v.21, p.703- 714, 2004.

DOMIJAN, A. M.; PERAICA, M., ZLENDER, V.; CVJETKÓVIC, B.; TOPOLOVEC-PINTAC JURJEVIC; IVIC'D. Seed-borne fungi and ochratoxina a contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L) in Replublic of Croatia, **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 427-432, 2005.

EATON, P.; FERNANDES, J. C.; PEREIRA, E.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Atomic forc microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Ultramicroscopy**, v. 108, p. 1128-1134, 2008.

EDRIS, A. E.; FARRAG, E. S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their majol aroma constituents on some plant pathogenic fung from the vapor phase. **Nahrung**, v. 47, n. 2, p. 117-121, 2003.

EL GHOUTH, E. A.; ARUL, J. GRENIER, J. ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v. 82, p. 398-402, 1992.

EL GHOUTH, A. et al. Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p.183-194, 1997.

EMBRAPA. **Fungos relatados em plantas no Brasil**. Disponível em:

<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbd04.asp>, acessado em Julho/2014.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Quitosanos em alimentação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p.435-451, 2008.

FENG, W.; ZENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126-1130, 2007.

LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 300-306, 2007.

FAO. **The State of Food Insecurity in the World**. Roma, Itália. p. 1-180, 2009a. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em julho de 2014.

FARR, D.F., & ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, **USDA**, 2014.

FERNANDO, G. D.; RAMARATHNAM, R. KRISHNAMOORTHY, A. S.; SAVCHUK, S. C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 37, p. 955-964, 2005.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella Bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 7/8, p. 483-487, 2000.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 219-226, mai-jun. 2008.

FREIRE, M. M. Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). **Dissertação** (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, 2006.

GADELHA, J. C. Controle preventivo e curativo da podridão pós-colheita de frutos de melão com produto alternativo. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará. p. 37, 2002.

GONÇALVES, F. P. Quantificação de danos e controle pós-colheita de podridão parda (*Monilinia fructicola*) e podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em frutos de ameixa e nectarina. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

HAN, C.; LEDERER, C.; MCDANIEL, M.; ZHAO, Y. Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 172- 178, 2005.

HENNIG, E. L. Utilização de Quitosana Obtida de Resíduos de Camarão para Avaliar a Capacidade de Adsorção de Íons Fe³⁺. **Dissertação** (Mestrado em Química Tecnológica e

Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RIO GRANDE DO SUL, 2009.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VALLE, V. DEL, MÉNDEZ-MONTEALVO, M. G., SÁNCHEZ-RIVERA, M. M., & BELLO-PÉREZ, L. A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehren.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 541-547, 2008.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org> Acessado em Julho de 2014.

ISMAIL, M.; ZHANG, J. Post-harvest citrus diseases and their control outlook. **Pest Manage.** v. 15, p. 29-35, 2004.

KAMOEN, O. Phytopathological role of secretions from *Botrytis cinerea* (1989). In: VERHOEFF, K.; MALATHRANKIS, N. E.; WILLIAMSOM, B. Recent advances in *Botrytis* research. Pudoc: **Wageningen**, p.18-21, 1992.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, n.4, v. 2, p. 542. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S.; Efficacy of *Mentha x piperita* and *Mentha citrate* essential oils against housefly *Musca domestica* L. **Industrial Crops and products**, n.39, p.106-112, 2012.

LI, H.. YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 2, p.269–274, 2001.

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, n.44, p.300-306, 2007.

MAAS, J. L. Compendium of strawberry diseases. 2 ed. St. Paul: **APS Press**, 98p.,1998.

MAFFEI, M.; MUCCIARELLI, M. Essential oil yield in peppermint/soybean strip intercropping. **Field crops Research**, v. 84, p. 229-240, 2003.

MAGRO, A.; CAROLINO, M.; BASTOS, M.; MEXIA, A.; Efficacy of plant extracts against stored products fungi. **Rev Iberoam Micol.** v. 23, n. 3, p 176-178, 2006.

MARTINEZ-CAMACHO, A.P.; CORTEZ-ROCHA, M.O.; EZQUERRA-BRAUER, J.M.; GRACIANO-VERDUGO, A.Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M.M.; YÉPIS-GOMEZ, M.S.; PLASCENCIA JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers** n.82 , p.305–315, 2010.

MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; MIO, L.L.M. de; BIASI, L.A.; GOUVEA, A. de; SAUTTER, C.K. Comportamento pós- colheita de frutos de morangueiro após a aplicação

pré- colheita de quitosana e acibenzolar- S- metil- 1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 185- 190, 2008.

MICHEREFF, S. J. **Controle biológico de doenças de plantas**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Disponível em <http://www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/T17.pdf> . Acesso em julho de 2014.

MÖLLER, H., GRELIER, S., PARDON, P., COMA, V. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan–HMPC based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 52, p. 6585–6591, 2004.

MONTEIRO, M. C. P. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. **Dissertação** (Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, 2012.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A. Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 37, 2005.

MOURA, C.M. Avaliação da reação de desacetilação da quitina e estudo da secagem de pellets de quitosana para a aplicação em filmes poliméricos. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), 2008.

NEVES, A. C.; SCHAFFNER, R. A.; KUGELMEIER, C. L.; WIEST, A. M.; ARANTES, M. K.; Otimização de processos de obtenção de quitosana a partir de resíduo da carcinicultura para aplicações ambientais. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**. v. 2, p. 34-47, 2013.

NICARETA, C. Óleos essenciais de *Solanum* e a interação com morcegos frugívoros. 2006. 77f. **Dissertação** (Mestrado em Química). Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná-PR, 2006.

NICOLAU, M. Esfera instrumentada de baixo custo para monitoramento de impactos e temperatura durante processos pós-colheita. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Elétrica). Universidade Estadual de Campinas, 2009.

NUNES, M. L. Farinha de pescado. Tecnologia do pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2011.

OJAGH, S. M., REZAEI, M., RAZAVI, S. H., & HOSSEINI, S. M. H. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, 120, 193-198, 2010.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and cloves essential oil against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomate paste. **Food Control**, n.18, v.12, p.1518-1523, 2007.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:h7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 14-20, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. Caracterização dos efeitos de quitosanas na inibição de fungos fitopatogênicos. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, 2006.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. Patologia Pós-colheita. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 855p, 2006.

PANKAJ, S.; SINGH, S. D.; RAWAL, P. Antifungal activity of some plant extracts and oils against seed-borne pathogens of pea. **Plant Disease Research Ludhiana**, v. 18, n. 1, p. 16-20, 2003.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; KOLE, C.. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. **Microbios**, v. 86, p. 237-246, 1996.

PEDRO, R.O.; TAKAKI, M.; GORAYEB, T.C.C; DEL BIANCHI, V.L.; THOMEO, J.C.; TIERA, M.J.; TIERA, V.A.O. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, 2012.

PEN, L.T.; JIANG, Y.M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. **Food Science and Technology**, v. 36, p. 359-364, 2003.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotecnológica**, v. 30, n. 4, p. 731-733, 2006.

PLASCENCIA-JATOMEA, M., VINIEGRA, G., OLAYO, R., CASTILLO-ORTEGA, M. M., & SHIRAI, K. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, p. 582-586, 2003.

RAMOS BERGER, L. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. n. 4, v. 12, p. 195-215, 2011.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M.R. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, n.15, p.79-483, 2004.

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, n.66, p.2851-2856, 2005.

REGNIER, T.; PLOOW, W. du; COMBRINCK, S.; BOTHA, B.; Fungitocity of *Lippia scaberrima* essential oil and select terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**. v. 48, p. 254-258, 2008.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in polymer science, **Science Direct**, 2006.

RODRIGUES, A. A. C. et al. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade

enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

RODRÍGUEZ, M. S., ALBERTENGO, L., DEBBAUDT, A., AGULLÓ, E. Uso del quitosano en alimentos. IN A. G. A. GONZÁLEZ, A. A. GARDEA, N. F. CUAMEA (EDS.), **Nuevas tecnologías de conservación de productos frescos cortados**, p. 558, 2005.

ROLLER, S., COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, n. 47, p. 66–77, 1999.

SAHARKHIZ, M. J; MOTAMEDI, M.; ZOMORODIAN, K.; PAKSHIR, K.; MIRI, R.; HEMYARI, K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. **ISRN Pharmaceutics**. 2012.

SÁNCHEZ-GONZÁLES, L.; PASTOR, P.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, CHÁFER, M. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. **Postharvest Biology and Technology**, n. 60, p. 57-63, 2011.

SAN-LANG, W.; SHIN, I. L.; WANG, C. H.; TSENG, K. C. CHANG, W. T; TWU, Y. K.; RO, J. J.; WANG, C. L. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*, *Enzyme and Microbial Technology*, n. 31, p. 321-328, 2002.

SANTOS, C. O. Óleo essencial de *Mentha piperita* L.: Uma breve revisão de literatura. **Trabalho de Conclusão de Curso**. João Pessoa: Universidade Estadual da Paraíba, 2011.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.5, p.476-482, 2006.

SANTOS, N.S.T.; AGUIAR, A.J.A.A.; OLIVEIRA, C.E.V.; SALES, C.V.; SILVA, S.M.; SILVA, R.S.; STAMFORD, T.C.M.; SOUZA, E.L. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.) **Food Microbiology**, v. 32, p. 345-353, 2012.

SCARIOT, G. N. Óleos essenciais no controle de mofo cinzento e podridão mole e seus efeitos na qualidade pós-colheita de morango. **Dissertação** (Agronomia). Universidade Federal do Paraná: Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, 2013.

SCHUHMACHER, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Virucial effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. **Phytomedicine**, v. 10, p. 504-510, 2003.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, D.; FRISVAD, J. C., VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: Fealq, 2005. p.125-32.

SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; CARNET-PANTIEZ, A.; GRELIER, S.; COMA, V. Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination. **Journal of Food Science**, v.70, n.2, p.100-104, 2005.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Isbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Microbiological Research**, v.163, n.3, p.337-344, 2007.

SHARMA, N. Pathogenecity of *Aspergillus niger* in plants. **Cibtech Journal of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 47-51, 2012.

SILVA, M.A.L. et al. Avaliação da composição química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá. Universidade Federal de Pernambuco, Acta Scientiarum, **Health Sciences**, v.32, n.1, p.67-72, 2010.

SILVEIRA F. S.; ROCZANSKI, M. **Desempenho da pesca e da aquicultura** In: Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2004 – 2005. Florianópolis: Epagri/Cepa. Secretaria de Estado e Desenvolvimento Rural e da Agricultura, p. 255-262, 2005.

SILVEIRA, N. S.S. et al. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatol. bras.**, v.26, n. 1, p.33-38, 2006.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.1-20, 2011.

SKRINJAR, M. M.; MANDIC, A. I.; MISAN, A. C.; SAKAC, M. B.; ZEC, M. M. Effect of Mint (*Mentha piperita* L.) and Caraway (*Carum carvi* L.) on the growth of some toxigenic *Aspergillus* species and Aflatoxin B1 production. **Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke**, v. 116, p. 131-139, 2009.

SOUZA, W. P.; QUEIROGA, C. L.; SARTORATTO, A.; HONÓRIO, S. L. Avaliação do teor e da composição química de óleo essencial de *Mentha piperita* (L.) Huds durante o período diurno em cultivo hidropônico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, p. 108-111, 2006.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATTEB, N. A. A.; Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. **Food Science and Nutrition**, n. 43, p. 144-171, 2003.

STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, v.2, n.11, p.16-24, 1999.

TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F.; CARELLE, M. S.; FALCIONI, L.; CIONI, P. L.; The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 45, p. 339, 2005.

TAVISH, H. M.; HARRIS, D. Na economic study of essential oil production in th UK: a case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production

with UK production techniques and costs. For The Government Industry, Forum for Non-Food Crops. **The Scotch Parliament**, Edinburg, 2002.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin: The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical. Rev. Food. Sci. Nutrit.** 43, 61-87, 2003.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Morango: Controle adequado, **Revista Cultiva**, 2005.

TOLAIMATEA, A; DESBRIERESB, J; RHAZIA, M; ALAGUIC, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. **Polymer**, 2003.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, n. 32, p. 235-245, 2004.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-8, 2005.

TSAI, G. J.; SU, W. H.; CHEN, H. C.; PAN, C. L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. **Fisheries Science**, n.68, p.170–177, 2002.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGDALO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, n. 122, p. 101-113, 2006.

TYAGI, A.K.; MALIK, A.; Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food control**, n.22, p.1707-1714, 2011.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 8, p. 253-258, 2007.

UNNIKRISHNAN, V.; NATH, B. S.; Hazardous chemicals in food. **Indian Journal of Dairy Bioscience**, v. 11, p.155-158, 2002.

UCSF – University of California, San Francisco. Department of Laboratory Medicine. **Morphology of Medically Important Fungi**, San Francisco, 2000. Disponível em : http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org/Education/fung_morph/homepage1.html Acesso em Julho/2014.

VARGAS, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 627-640, 2004.

VARGAS, M., ALBORS, A., CHIRALT, A., GÓNZALEZ-MARTINEZ, C. Quality of Cold stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, n.41, p.164–171, 2006.

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. Podridões de Maças frigorificadas. In: GIRARDI, C. L. (Org). Frutas do Brasil, Maçã Pós-colheita. Brasília: **Embrapa**: 2004. P. 35-44

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C. S. F.; MARQUES, M. O. M.; FERRI, A. F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 56-61, 2006.

VIEGAS, E.C.; SOARES, A.; CARMO, M.G.F.; ROSSETTO, C.A.V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.915-919, out-dez 2005.

VINAS, I.; USALL, J.; SANCHIS, V. Tolerance of *Penicillium expansum* to post-harvest fungicide treatments in apple packing-houses in Lerida (Spain). **Mycopathologia**, v. 113, p. 15-18, 1991.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995.

WANG, S.Y.; CHEN, P.F.; CHANG, S.T.; Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresour. Technol**, v. 96, p. 813–818, 2005.

WANG, Y.; YU, T.; LI, Y.; CAI, D.; LIU, X.; LU, H.; ZHENG, X. D. Postharvest biocontrol of *Alternaria alternata* in Chinese winter jujube by *Rhodosporidium paludigenum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p.1492-1498, 2009.

XING, Y., XU, Q., LI, X., CHE, Z., & YUN, J. Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* *in vitro* and in wounded fruit test. **Journal of Food Safety**, v. 32, p. 84-93, 2012.

YADAV, A.V.; BHISE, S. B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1176-1178, 2004.